

## Aspergillus niger SFN-4160이 생산하는 Xylanase I의 정제 및 특성

성찬기\* · 이상원\*\* · 박석규† · 전순실

\*중앙대학교 화학과

\*\*경상대학교 식품공학과

순천대학교 식품영양학과

### Purification and Characterization of Xylanase I from *Aspergillus niger* SFN-416

Chan-Ki Sung\*, Sang-Won Lee\*\*, Seok-Kyu Park† and Soon-Sil Chun

\*Dept. of Chemistry, Chung-Ang University, Seoul 156-757, Korea

\*\*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea  
Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

#### Abstract

Xylanase(EC. 3. 2. 1. 8) was purified approximately 10.2 fold from *Aspergillus niger* SFN-416 by a sequential process of ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-Sephacel ion exchange chromatography. Molecular weight of the enzyme was approximately 31,000 daltons. The optimum pH and temperature of the enzyme activity were 3.5 and 50°C, respectively. The enzyme activity was enhanced by Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, and inhibited by Hg<sup>2+</sup>. The activity was decreased by addition of methanol, ethanol, isopropanol and 1-butanol at a concentration of 10%(v/v).

**Key words:** *Aspergillus niger*, xylanase, purification, characterization

#### 서 론

고등식물 세포벽의 주성분 중에 하나인 xylan은 hemicellulose의 주성분으로 식물 세포벽의 cellulose와 lignin 성분과 결합되어 있다. Xylan은 대체 에너지원인 알코올 생산의 기질로서 주목을 받고 있는 중요한 biomass 자원이다.

Xylan은 많은 세균과 곰팡이들에 의해서 생성되는 endo-1,4-xylanase(EC 3.2.1.8)와  $\beta$ -xylosidase(EC 3.2.1.37)의 동시작용에 의해 가수분해 되어진다(1). 즉 이들 미생물들은 acetyl, arabinosyl과 glucuronosyl 잔기들로 치환된  $\beta$ -1,4-D-xylopyranoside 잔기들의 선형 polymer인 xylan의  $\beta$ -1,4결합을 절단하는 xylanase를 생산하며, 그외  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase 및 esterase 등의 다양한 효소들을 생성하므로 xylan을 탄소원으로 이용하여 성장한다(2-5).

Xylanase는 식물체의 질병인자로서의 역할은 아직 명확하게 알려져 있지는 않지만, 숙주와 질병의 상관

관계에서의 연관 가능성에 대하여 몇가지 보고들이 있다(6-8). 미생물의 xylanase는 펄프와 제지산업에 응용하기 위해 상당한 관심을 가지고 있다. 왜냐하면 효과적인 생물표백제를 선택하므로서 chloride와 chlorine dioxide 같은 독성 화학제품의 소비를 상당히 감소시킬 수 있는 원인이 된다(9).

본 연구에서는 제지산업, 식품산업, 환경분야, 알코올생산 및 의약품분야 등에 상당히 관련이 많은 xylanase를, 유기용매에 비교적 안정한  $\beta$ -glucosidase를 우수하게 생산하는 균주로서 분리·동정한 바 있는(10) *Aspergillus niger* SFN-416으로부터 생산하여 그 정제 특성과 효소 성질을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주 및 배지

공시균주는 순천대학교 공업기술연구소에 보관중인 *Aspergillus niger* SFN-416(10)을 사용하였다. 보

† To whom all correspondence should be addressed

존 및 포자형성용 배지는 각각 potato dextrose agar (PDA) 및 malt extract agar(MEA) 배지를 사용하였으며, 효소생성의 기본배지(11)는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4g, urea 0.3g,  $\text{CaCl}_2$  0.3g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g, Bacto peptone 1.0g, carboxymethyl cellulose(CMC) 10.0g, trace solution 1.0ml( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5%,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.16%,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.14%,  $\text{CoCl}_2$  0.2%), tween 80 2.0g, DW 1.0L로 조제하여 사용하였다.

#### 균주 배양 및 조효소액 조제

효소 생산용 액체배지 10ml를 L-type 시험관에 넣어 살균(121°C, 10min)하고, 포자현탁액 0.5ml를 무균상 내에서 집중하여 30°C에서 5일 동안 진탕배양(120 rpm, storke 5.4cm)한 다음, 배양액을 8,000rpm에서 20분간 원심분리(Vision, VS-15-CF)하였다. 그 상침액을 -20°C로 냉각시킨 ethanol를 가하여 얻은 70% ethanol(v/v) 침전물을 8,000rpm에서 20분간 원심분리시킨 후, 0.02M acetate buffer(pH 4.0)에 용해시켜 조효소로 사용하였다.

#### 활성도 및 단백질 정량

효소 활성 측정은 0.05M sodium phosphate buffer (pH 5.5)에 용해한 1% xylan를 효소와 혼합한 다음, 50°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS법(12)을 이용하여 510nm(UV/VIS spectrophotometer, Hewlett Packard 8452A)에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 50°C에서 1분간 1 $\mu$ mole의 환원당을 생성하는 효소량을 1unit로 표시하였다.

단백질의 농도는 Lowry 등(13)의 방법에 따라 측정하였으며, 이 때 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 작성하여 정량하였다.

#### 정제

조효소를 4°C에서 ammonium sulfate로 30% 포화시켜 1시간 동안 방치시킨 후, 8,000rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 모아 4°C에서 ammonium sulfate로 90% 포화시켜 하룻밤 방치시킨 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.02M acetate buffer(pH 4.0)로 용해시켰다.

Sephadex G-100을 0.02M acetate buffer(pH 4.0)로 상온에서 72시간 동안 부풀린 후 분류관(10×900mm)에 충전시키고 0.02M acetate buffer(pH 4.0)로 평형시킨 후, ammonium sulfate(30~90%)로 포화시켜 부분

정제된 효소를 0.02M acetate buffer(pH 4.0)로 용출시켰다. 이때 유출 속도는 3ml/hr로 하였고, 용출액은 3ml씩 각 시험관에 받았다. 이의 각 용출액은 280nm에서 단백질을 확인한 다음, 510nm에서 효소 활성도를 측정하여, 활성도가 큰 부분만을 모아 냉동건조기로 농축시켜 다음 정제과정의 효소로 사용하였다.

DEAE-Sephacel은 0.02M acetate buffer(pH 4.0)로 씻은 다음, 분류관(150×280mm)에 충전시키고 0.02M acetate buffer(pH 4.0)로 평형을 유지시켰다. 이 분류관은 Sephadex G-100 column chromatography에 의하여 모은 효소를 흡착시킨 후 0~0.5M NaCl로 linear gradient하여 용출시켰다. 이 때 용출속도는 12ml/hr로 하였고, 용출액은 3ml씩 각 시험관에 받아서 단백질과 효소의 활성도를 측정한 다음, 활성도가 큰 분획만을 모아 이를 정제된 효소액으로 사용하였다.

#### 분자량 측정

정제된 효소의 순도 및 분자량을 측정하기 위해서 SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동을 Laemmli의 방법(14)으로 행하였다. 이때 10% polyacrylamide gel을 사용하여 25mA로 3시간 동안 전기영동하였다. 영동이 끝난 gel은 0.25% coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 다음 탈색시켜 정제상태와 분자량을 관찰하였다.

분자량을 결정하기 위하여 표준단백질(BIO-RAD)을 함께 전기영동하여 그들의 상대적 이동거리의 값으로 표준곡선을 작성하여 분자량을 결정하였다. 표준단백질로는  $\alpha$ -lactalbumin(14,200 daltons), trypsin inhibitor(20,100 daltons), trypsinogen(24,000 daltons), carbonic anhydrase(29,000 daltons), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000 daltons), albumin egg(45,000 daltons), albumin bovine(66,000 daltons)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

#### Xylanase의 정제

*Aspergillus niger* SFN-416으로 부터 생성한 xylanase는 70% ethanol(v/v) 침전물, ammonium sulfate (30~90%)로 얻은 효소를 Sephadex G-100(Fig. 1) 및 DEAE-Sephacel column chromatography(Fig. 2)하여 xylanase 활성을 나타내는 두 종류의 peak를 얻었는데 이들 중 앞쪽 peak(xylanase I)를 이후의 실험에 이용하였으며, 뒤쪽 peak(xylanase II)는 현재 실험 중에 있다.

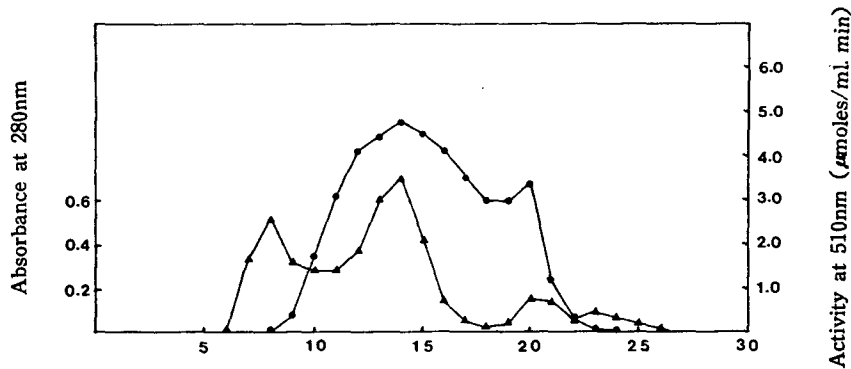


Fig. 1. Elution profile of xylanase I on Sephadex G-100 column chromatography(10×900mm). An aliquot of each fraction was assayed for xylanase I activity(●-●) and protein(▲-▲)

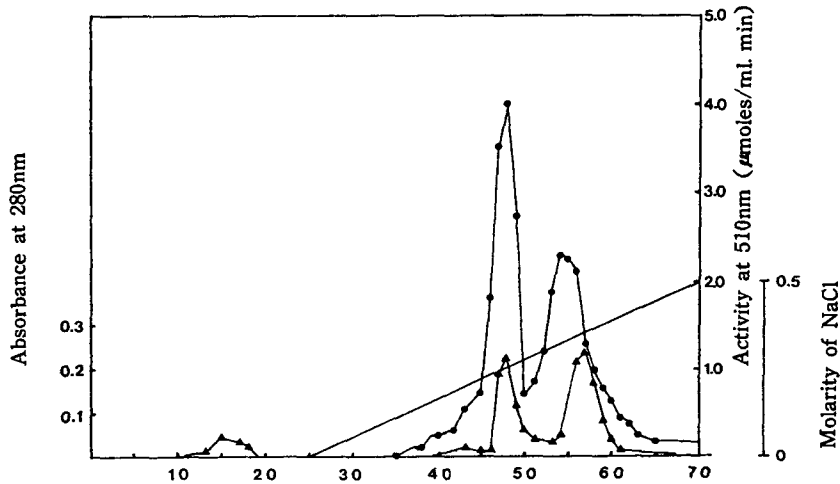


Fig. 2. Elution profile of xylanase I on DEAE-Sephacel column chromatography(150×280mm). An aliquot of each fraction was assayed for xylanase I activity(●-●) and protein(▲-▲). A linear gradient indicated by the solid line.

각 단계별 specific activity는 조효소에서 8.8units/mg protein, ammonium sulfate 침전법 9.5units/mg protein, Sephadex G-100 17.4units/mg protein 및 DEAE-Sephacel 89.9units/mg protein으로 각각 1.2, 2.0, 10.2배 정제되었다.

한편, 배와 최(15)은 알칼리성 용액에서 높은 효소 활성을 나타내는 *Bacillus stearothermophilus*의 specific activity가 17.68units/mg으로 27.63배의 정제도를 보고하였고, Peltonen 등(16)은 *Bipolaris sorokiniana*의 specific activity가 125nkat/mg으로 13배의 정제도를, Li 등(17)은 *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1의 specific activity가 2,440units/mg으로 5.8배 정제도를 보고한 바 있다.

분자량

정제된 xylanase I는 SDS-polyacrylamide slab gel

전기영동을 하여 순도 및 분자량을 측정된 결과(Fig. 3), *Aspergillus niger* SFN-416으로부터 생성한 xylanase I의 분자량은 31,000 daltons으로 확인되었다. 한편, 배와 최(15)은 *B. stearothermophilus*가 생산하는 xylanase의 분자량은 170,000 daltons으로, Braun과 Rodrigues (18)은 *Erwinia chrysanthemi*가 생산하는 xylanase의 분자량은 42,000 daltons, 조 등(19)의 *Penicillium verruculosum*이 생산하는 D-xylanase의 분자량은 35,000 daltons으로 보고하였다.

온도의 영향

Xylanase I의 활성에 미치는 온도효과를 측정하기 위하여 0.05M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 xylan을 1% 되게 용해시키고, 이 용액을 취하여 온도를 20°C에서 70°C까지 변화시키면서 정제된 효소액을 하

Table 1. The purification of xylanase I from *Aspergillus niger* SFN-416

Purification step	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	125.0	858.4	97.5	8.8	1.0	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30~90%)	3.6	436.8	45.9	9.5	1.2	50.9
Sephadex G-100	60.0	415.2	23.8	17.4	2.0	48.4
DEAE-Sephacel	12.0	98.9	1.1	89.9	10.2	11.5

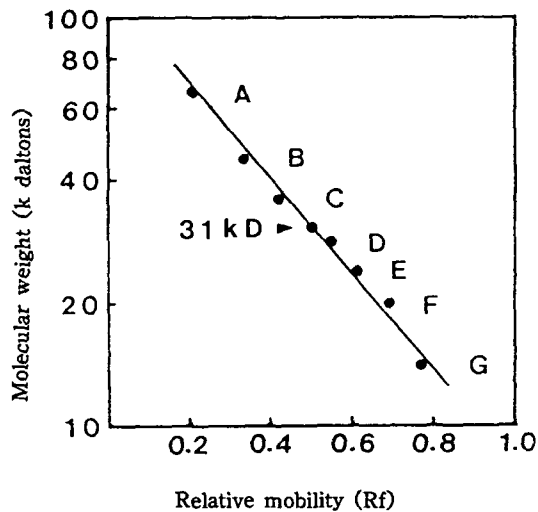


Fig. 3. Molecular weight determination of xylanase I from *Aspergillus niger* SFN-416 by SDS-PAGE. A ; Albumin, bovine(66,000 daltons), B ; Albumin, egg(45,000 daltons), C ; Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000 daltons), D ; Carbonic anhydrase(29,000 daltons), E ; Trypsinogen(24,000 daltons), F ; Trypsin inhibitor(20,100 daltons), G ;  $\alpha$ -Lactalbumin(14,200 daltons)

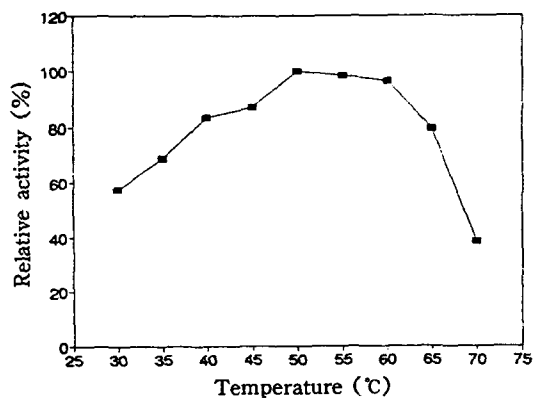


Fig. 4. Effect of temperature on xylanase I activity of *Aspergillus niger* SFN-416.

The reaction mixture, consisted of 0.25ml enzyme solution and 0.75ml 1% xylan, was incubated at 30~70°C for 10min. The maximum activity was expressed as 100%.

고 활성을 측정할 결과(Fig. 4), 50°C에서 최대 활성을 보였다. Peltonen 등(16)은 *B. sorokiniana*에서 생산되는 xylanase의 최대 활성온도가 70°C로서 상당히 높은 온도임을 보고하였고, 배와 최(15)은 *B. stearothermophilus*의 최적 반응온도가 55°C로, Li 등(17)은 *A. pululans* Y-2311-1의 xylanase의 최대 활성온도가 54°C로서 본 xylanase I의 최적 온도와 비슷한 것으로 나타났다.

#### pH의 영향

Xylanase I의 활성에 미치는 최적 pH를 측정하기 위하여 citrate-phosphate buffer(pH 3.0~6.5), phosphate buffer(pH 7.0~8.0)를 조제하여 xylan을 1% 되게 용해시켜, 이 용액을 취하여 정제된 효소액을 가한 다음 그 활성을 측정할 결과(Fig. 5), pH 3.5 부근에서 최적 활성을 나타내었다. Morales 등(20)은 *Bacillus polymyxa*로부터 생성된 alkaline xylanase의 X<sub>34</sub>C가 45°C, pH 6.0~7.0 사이에서 최적 활성을, X<sub>34</sub>E가 50°C, pH 4.0~6.0 사이에서 최대 활성을, X<sub>22</sub>가 55°C, pH 6.0~7.0 사

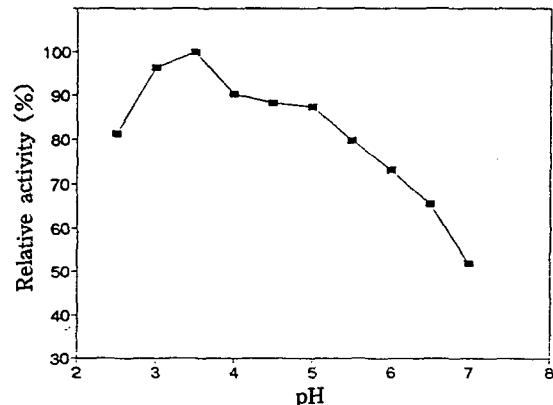


Fig. 5. Effect of pH on xylanase I activity of *Aspergillus niger* SFN-416.

The reaction mixture, consisted of 0.25ml enzyme solution and 0.75ml 1% xylan, was incubated at 50°C for 10min. The maximum activity was expressed as 100%.

pH 3.0~6.5: Citrate-phosphate buffer  
pH 7.0~8.0: Sodium phosphate buffer

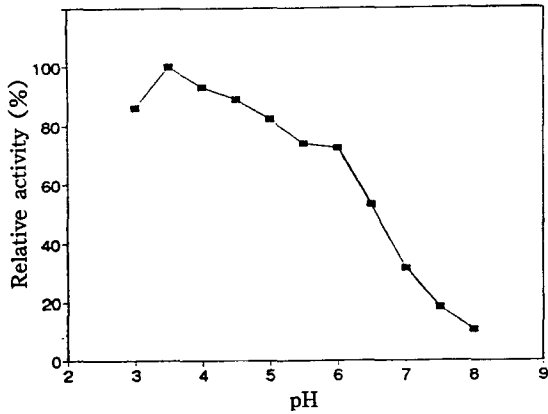


Fig. 6. Effect of pH stability on xylanase I of *Aspergillus niger* SFN-416.

The reaction mixture, consisted of 0.25ml enzyme solution(preincubated for 1hr at each pH) and 0.75ml 1% xylan, was incubated at 50°C for 10min. The maximum activity was expressed as 100%.  
pH 3.0~6.5: citrate-phosphate buffer  
pH 7.0~8.0: sodium phosphate buffer

이에서 최적 활성을 가지는 것으로 보고 하였고, 배 등(15)은 *B. stearothersophilus*로 부터 생산되는 xylanase는 pH 5.0~7.0 사이에서 비교적 안정한 것으로 보고 하였고, Braun과 Rodrigues(18)는 *E. chrysanthemi*로 부터 생성된 xylanase는 pH 5.5에서 최적 활성을 가지는 것으로 보고하였다.

본 xylanase I은 이들 효소 보다 낮은 pH에서 최적 활성을 나타내는 것으로 생각된다. pH 안정성을 측정하기 위하여 citrate-phosphate buffer(pH 3.0~6.5), phosphate buffer(pH 7.0~8.0)를 조제하고, 이 용액을 취하여 정제된 효소액을 가하고 50°C에서 1시간 동안 방치한 후 1% xylan를 가하여 활성을 측정 한 결과(Fig. 6), pH 3.5에서 최대 활성을 보이고, pH 6.0 이상에서 활성이 급격히 감소함을 보였다. Braun과 Rodrigues(18)는 *E. chrysanthemi*로 부터 생성된 xylanase가 상당히 넓은 pH에서 안정함을 보였으며, 배와 최(15)은 *B. stearothersophilus*가 생산하는 xylanase는 pH 5.0~7.0 사이에서 비교적 안정한 것으로 보고 하였고, 김 등(21)은 *Bacillus* sp. N-25가 생산하는 xylanase는 pH 6.0~8.0 사이에서 안정한 것으로 보고하였다.

금속이온의 영향

금속이온들이 xylanase I 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.05M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 xylan을 1% 되게 용해시키고, 이 용액에 각 금속이온들의 농도를 2mM 되게 하여 50°C를 유지시키면서

Table 2. Effect of metal ions on xylanase I activity of *Aspergillus niger* SFN-416

Ions	Concentration(mM)	Relative inhibition(%)
None	0	100
K <sup>+</sup>	2	92.2
Na <sup>+</sup>	2	92.5
Ca <sup>2+</sup>	2	97.0
Hg <sup>2+</sup>	2	18.5
Sn <sup>2+</sup>	2	94.0
Mg <sup>2+</sup>	2	83.6
Cu <sup>2+</sup>	2	64.8
Fe <sup>2+</sup>	2	117.0
Mn <sup>2+</sup>	2	129.9
Zn <sup>2+</sup>	2	77.9

The reaction mixture, consisted of 0.25ml enzyme solution and 0.75ml 2mM metal ions in 1% xylan, was incubated at 50°C for 10min. The maximum activity was expressed as 100%

정제된 효소액을 가하여 활성을 측정 한 결과(Table 2), 대부분의 금속이온에 효소활성이 저해되었고, 특히 Hg<sup>2+</sup>는 18.5%의 가장 낮은 상대활성을 나타내었다. 그렇지만 Fe<sup>2+</sup>는 117.0%, Mn<sup>2+</sup>는 129.9%로 효소활성을 증가시켰다. 배와 최(15)은 *B. stearothersophilus*가 생산하는 xylanase는 Mn<sup>2+</sup>와 Co<sup>2+</sup>에서 효소활성을 증가시키고, Hg<sup>2+</sup>는 저해효과를 나타내는 것으로 보고한 것과 비슷한 결과가 본 연구에서도 나타났다. Braun과 Rodrigues(18)은 *E. chrysanthemi*에서 생성되는 xylanase가 1mM Hg<sup>2+</sup>, 1mM Ag<sup>+</sup>에서 완전히 저해되는 것으로, Park 등(22)은 알칼리내성 *Bacillus* sp. YA-14에서 생성되는 xylanase는 Hg<sup>2+</sup>에 의해 강하게 저해됨을, 김 등(21)은 *Bacillus* sp. N-25에서 생성되는 xylanase는 Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>에 의해 저해됨을 보고하였다.

유기용매의 영향

유기용매가 xylanase I 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.05M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 methanol, ethanol, isopropanol 및 1-butanol 각각의 농도를 10%(v/v) 되게 하고, xylan을 1% 되게 용해시켜, 50°C를 유지시키면서 정제된 효소액을 가하여 활성을 측정 한 결과(Table 3), 모두 낮은 활성을 나타내었고, 특히 1-butanol에서 상대활성이 18.5%로 가장 낮았다.

Xylanase I 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.05M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 methanol, ethanol, isopropanol 및 1-butanol 각각의 농도를 10%(v/v) 되게 하고 정제된 효소액을 가하여 50°C를 유지시키면서 30분간 방치한 후 1% xylan를 가하여 활성

**Table 3. Effect of organic solvents on xylanase I activity of *Aspergillus niger* SFN-416**

Organic solvents	Concentration(%)	Relative activity(%)
None	0	100
Methanol	10	74.3
Ethanol	10	68.4
Isopropanol	10	67.5
1-Butanol	10	18.5

The reaction mixture, consisted of 0.25ml enzyme solution containing 10% organic solvent and 0.75ml 1% xylan, was incubated at 50°C for 10min. The maximum activity was expressed as 100%

**Table 4. Effect of organic solvents on stability of xylanase I of *Aspergillus niger* SFN-416**

Organic solvents	Concentration(%)	Relative activity(%)
None	0	100
Methanol	10	72.2
Ethanol	10	70.0
Isopropanol	10	68.9
1-Butanol	10	67.0

The reaction mixture, consisted of 0.25ml enzyme solution(preincubated for 30min. in 10% organic solvent) and 0.75ml 1% xylan, was incubated at 50°C for 10min. The maximum activity was expressed as 100%

을 측정 한 결과(Table 4), 모두 낮은 상대활성을 나타내었다. 이상의 결과로 부터 *Aspergillus niger* SFN-416 이 생산하는 xylanase I 은  $\beta$ -glucosidase(10) 보다 유기용매에 안정하지 않은 것으로 생각된다.

## 요 약

*Aspergillus niger* SFN-416으로 부터 생성한 xylanase I 을 분리 · 정제하여 특성을 조사하였다. *Aspergillus niger* SFN-416의 배양액을 ethanol(70%) 침전,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30~90%) 침전, Sephadex G-100 chromatography 및 DEAE-Sephacel ion chromatography 등의 정제과정을 거친 결과, 10.2배 정제되었고, 정제효소의 최적 활성온도는 50°C였다. 최적 pH는 3.5이었고, pH 안정성은 6.0 이상에서 활성이 급격히 감소하였다. 또한 금속이온에 대한 효소의 활성은 대부분 억제를 보였고, 특히  $\text{Hg}^{2+}$ 는 18.5%로 가장 낮은 상대활성을 보였지만,  $\text{Fe}^{2+}$ 는 117.0%,  $\text{Mn}^{2+}$ 는 129.9%로 오히려 효소활성이 증가되었다. 정제 효소의 분자량은 SDS-PAGE에 의하여 31,000 daltons이었으며, 유기용매에 대한 활성과 안정성은 10%의 methanol, ethanol, isopropanol 및 1-butanol에 대하여 모두 낮은 활성을 나타내어 유기용매에는 안정하지 않은 것으로 생각된다.

## 문 헌

- Dekker, R. F. H. and Richards, G. N. : Purification, properties and mode of action of hemicellulase II by *Ceratocystis paradoxa*. *Carbohydrate Research*, **42**, 107(1975)
- Biely, P., Puls, J. and Schneider, H. : Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic system. *FEBS Lett.*, **186**, 80(1985)
- Dekker, R. F. H. : Biodegradation of the hemicelluloses. In "Biosynthesis and biodegradation of wood components" Higuchi, T.(ed.), Academic Press, Inc., Orlando, Fla., p.505(1985)
- Thomson, J. A. : Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **104**, 65(1993)
- Woodward, J. : Xylanase : functions, properties and application. *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.*, **8**, 9 (1984)
- Hancock, J. G. : Hemicellulose degradation in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotium Phytopathology*, **57**, 203(1967)
- Van Etten, H. D. and Bateman, D. F. : Enzymatic degradation of galactan, galactomannan and xylan by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **59**, 968(1969)
- Mullen, J. M. and Bateman, D. F. : Polysaccharide degrading enzymes produced by *Fusarium roseum* 'Avenaceum' in cultures and during pathogenesis. *Physiological Plant Pathology*, **6**, 233(1975)
- Viikari, L., Kantelinen, A., Ratto, M. and Sundguist, J. : In ACS Symp. Ser. 460 : Leatham, G. E. and Himmel, E. M.(eds.), American Chemical Society, Washington DC.(1990)
- 박석규, 문일식, 성낙계 :  $\beta$ -Glucosidase를 생산하는 균주의 분리 및 조효소의 특성. *산업미생물학회지*, **21**, 440(1993)
- Mandels, M. and Reese, E. T. : Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metal. *J. Bacteriol.*, **73**, 269(1957)
- Miller, G. L. : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1956)
- Lowry, O. H., Resebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein estimation with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, **227**, 680(1970)
- 배성호, 최용진 : *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 xylanase의 정제 및 특성. *산업미생물학회지*, **19**, 592(1991)
- Peltonen, S., Karjalainen, R. and Niku-Paavola, M. L. : Purification and characterization of xylanase from *Bipolaris sorokiniana*. *Mycological Research*, **98**, 67 (1994)
- Li, X. L., Zhang, Z. Q., Jeffrey, F. D. D., Karl-Erik, L. E. and Lars, G. L. : Purification and characterization of a new xylanase(APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 3212(1993)

18. Braun, E. J. and Rodrigues, C. A. : Purification and properties of an endoxylanase from a corn stalk rot strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology*, **83**, 322(1993)
19. 조남철, 권수진, 김강화, 정기철 : *Penicillium verruculosum*으로부터 D-xylanase의 정제 및 특성. 한국생화학회지, **25**, 670(1992)
20. Morales, P., Madarro, A., Perez-Gonzalez, J. A., Sendra, J. M., Pinaga, J. M. F. and Flors, A. : Purification and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus Polymyxa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 1376(1993)
21. 김원곤, 이찬용, 이계호 : *Bacillus* sp. N-25가 생산하는 xylanase의 특성. 산업미생물학회지, **20**, 559(1992)
22. Park, Y. S., Yum, D. Y., Hahm, B. K., Bai, D. H. and Yu, J. H. : Purification, characterization and chemical modification of the xylanase from alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14. *J. Microbiol. Biotech.*, **4**, 41(1994)

(1996년 5월 24일 접수)